Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. E. Bock

Untersuchungen zur Immunologie des Insulins

A) Schwund von ^{131}J-Insulin aus dem Serum insulinsensibilisierter Kaninchen

B) Geschwindigkeit der Neubildung von Insulinantikörpern

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gerhard Weiss
aus Stuttgart

1968

9495

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547604_0057

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. E. Bock

Untersuchungen zur Immunologie des Insulins

A) Schwund von ^{131}J-Insulin aus dem Serum insulinsensibilisierter Kaninchen

B) Geschwindigkeit der Neubildung von Insulinantikörpern

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gerhard Weiss
aus Stuttgart

1968

Durchgeführt mit dankenswerter Unterstützung
der Deutschen Forschungsgemeinschaft

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. W. Graumann

1. Berichterstatter: Professor Dr. E. Kallee
2. Berichterstatter: Professor Dr. H.E. Bock

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

INHALT

Untersuchungen zur Immunologie des Insulins

A) Schwund von ^{131}J-Insulin aus dem Serum insulinsensibilisierter Kaninchen.

B) Geschwindigkeit der Neubildung von Insulinantikörpern

	Seite
Einleitung	1
Methoden	3
Ergebnisse	6
Diskussion	10
Abbildungen und statistische Daten	12
Zusammenfassung	22
Literaturverzeichnis	23
Lebenslauf	

Einleitung

Nach Untersuchungen von BERSON et al. (1956) und SKOM u. TALMAGE (1958) treten bei längerer Behandlung mit tierischem Insulin im Serum des Diabetikers humorale Insulinantikörper auf. Diese Antikörper präzipitieren das Insulin nicht, sondern binden es reversibel. HIRATA u. BLUMENTHAL (1963) haben jedoch bei Meerschweinchen und Kaninchen präzipitierende Antikörper gegen Insulin nachgewiesen. Auch RENOLD et al. (1963) berichteten über das passagere Auftreten insulinpräzipitierender Antikörper bei Rindern.

Eine Beziehung zwischen dem Grad einer Insulinresistenz beim Menschen und der Höhe des Insulinantikörpertiters scheint nicht direkt, sondern nur statistisch zu bestehen. BERSON et al. (1956) konnten zeigen, daß bei Vorhandensein von Insulinantikörpern intravenös injiziertes ^{131}J-Insulin verlangsamt aus der Blutbahn schwindet. Im Gegensatz dazu werden injizierte Antigene bei hyperimmunisierten Tieren beschleunigt eliminiert, wenn sich in der Blutbahn präzipitierende Antikörper befinden (DIXON et al. 1954, UEBELE 1964, NAST 1968). Auch bei Kaninchen, die gegen Rinderalbumin hyperimmunisiert waren, trat ein beschleunigter Abfall der Radioaktivität von ^{131}J-Rinderinsulin auf. (D'ADDABBO et al. 1960, D'ADDABBO u. KALLEE 1961). Insulinantikörper treten im allgemeinen erst etwa ab der dritten bis sechsten Woche nach Beginn der Insulintherapie auf. Dagegen können bei manchen Menschen schon binnen einer Woche nach der erstmaligen Verabreichung sehr hoher Insulindosen insulinbindende Antikörper im Gammaglobulinbereich auftreten. (KALLEE, WILMANNS u. WEISS 1963).

Da zu vermuten war, daß die Geschwindigkeit der Antikörperbildung unter anderem von der Insulindosis abhängig sein könnte, wurden für die vorliegende Arbeit Kaninchen gegen hohe Dosen Schweineinsulin sensibilisiert. Ein Teil der Versuchstiere erhielt ansteigend Insulin, ein anderer Teil der Versuchstiere nur alle zwei Wochen eine Injektion verabreicht. Die Versuchstiere erhielten dann ^{131}J-markiertes Rinderinsulin intravenös injiziert. Der Schwund des radioaktiven Insulins im Serum der Tiere wurde anschließend gemessen und mit dem Schwund bei nicht sensibilisierten Kontrolltieren verglichen.

Als Versuchstier wurde das Kaninchen aus mehreren Gründen gewählt. Erstens lagen bisher in der Literatur noch keine Berichte über das Auftreten insulinbindender Antikörper beim Kaninchen vor (Als Standardversuchstier für die Gewinnung von Insulinantikörpern dient allenthalben das Meerschweinchen). Zweitens ist das Blutvolumen von Kaninchen groß genug für viertelstündliche Blutentnahmen. Drittens sollte versucht werden, größere Mengen Insulinantikörper von Kaninchen zu gewinnen. Im Gegensatz zu Meerschweinchengammaglobulin gehen nämlich Kaninchengammaglobuline keine immunologische Kreuzreaktion mit Humangammaglobulin ein. Diese Kreuzreaktion kann sich bei der Bestimmung des Insulinspiegels in Humanseren störend auswirken. Schließlich sind Kaninchen für szintigraphische Untersuchungen mit dem Isotop ^{131}J besser geeignet als kleinere Versuchstiere, da die Sekundärstrahlung dieses Nuklids das Auflösungsvermögen des Strahlungsdetektors umso weniger beeinträchtigt, je größer das Versuchsobjekt ist.

Methoden

1) Einjährige, drei bis vier Kilogramm schwere männliche und weibliche Kaninchen wurden fünfundvierzig Tage lang jeden zweiten Tag mit steigenden Mengen - Anfangsdosis 10 mg je Tier, ansteigend bis zu 80 mg pro die - von Cystein-inaktiviertem Schweineinsulin (Novo) sensibilisiert. Ein anderer Teil der Versuchstiere bekam 14-täglich je 180 IE - 200 IE (≙ 7-8 mg) Kristallines Schweine- und Rinderinsulin (Hoechst) zusammen mit komplettem Freund'schem Adjuvans (Difco, Detroit) subcutan injiziert. Ein Teil der mit Freund'schem Adjuvans behandelten Tiere ging im Verlauf der Versuche an Querschnittslähmung oder an Nierenversagen ein. Ein anderer Teil der Tiere zeigte unter der Haut bis zu apfelgroße, verkäsende Fremdkörpergranulome, die wahrscheinlich auf das im Freund'schen Adjuvans enthaltene Öl zurückzuführen sind. Von 55 Kaninchen ging etwa die Hälfte ein.

2) Vor Versuchsbeginn bekamen die Kaninchen 10 mg Kaliumjodid subcutan injiziert, um eine Anreicherung von radioaktivem ^{131}J in der Schilddrüse zu verhindern.
Von einer ^{131}J-Rinderinsulinlösung (Hoechst, 645 µCi/ml ≙ 34 µg Insulin/ml) wurde den Tieren 0,54 µg Insulin entsprechend 10 µCi ^{131}J in 0,15 ml physiologischer Kochsalzlösung intravenös verabreicht. Die Blutentnahme an den Ohrvenen erfolgte 10, 25, 40, 55, 70, 85, 100, 115 Minuten nach der Injektion. Nach etwa ein bis zweistündigem Stehen wurde das Blut abzentrifugiert und in einem Milliliter Serum die Radioaktivität bestimmt.

3) Standardlösungen für die Radioaktivitätsmessungen. 0,15 ml ^{131}J-Insulin (Hoechst) entsprachen 100 µCi + 1,35 physiologischer Kochsalzlösung. Davon wurde 0,15 + 5 ml einer 7 mg-prozentigen Rinderinsulinlösung (Hoechst) auf 100 ml mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt. Diese Verdünnung entsprach also der verabreichten Insulindosis von 10 µCi in 100 ml.
Als Standard für die Messung der Trichloressigsäure (= TCA) - Präcipitate wurde jeweils ein ml der obigen Standardlösungen mit einem ml Kaninchennormalserum versetzt und nach dem folgenden Vorgehen mit TCA gefällt und gemessen.

4) Zur Ausfällung wurde ein ml Serum mit einem ml TCA (10 %) versetzt und 10 Minuten bei ca. 3000 Umdrehungen pro Minute (≙ ca. 1500 $\bar{g}$) zentrifugiert. Das Sediment, 0,5 ml, wurde noch zweimal mit je 5 ml TCA (5 %) versetzt, gründlich aufgerührt und,wie oben angegeben, abzentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Radioaktivität des Sediments bestimmt. Die Meßergebnisse wurden in Prozent des Standards umgerechnet. Die Messungen erfolgten in einem Szintillationsbohrlochkristall (FH 781) mit einem Einkanalimpulshöhenanalysator (FH 62, Frieseke und Höpfner, Erlangen) der an ein Strahlungsmeßgerät (FH 498) angeschlossen war. Bei einer Hochspannung von 0,75 kV lagen die Optima für ^{131}J bei Verstärkung 16, Kanalbreite 15 V, Kanallage 29 V.

5) Agargel-Elektrophoresen.
1,5 g Sepezial Agar Noble (Difco-Detroit) wurden in 100 ml 1:5 verdünntem Veronal-Natrium-Azetatpuffer (PH 8,6) gelöst. In die Rinne wurde mit ^{131}J-Insulin inkubiertes Serum von insulinsensibilisierten Kaninchen aufgetragen. Die Laufzeit betrug 75 Minuten bei 180 V und 18 m A für einen Ansatz von 18 Objektträgern (LKB Apparatur, Colora Lorch). Anschließend wurden die Plättchen getrocknet und auf Röntgenfilm autoradiographiert.

6) Ganzkörperszintigramm.
Ein gegen Cysteinaktiviertes Schweineinsulin sensibilisiertes Tier wurde in Evipannarkose gelegt und bekam 100 µCi ^{131}J-Rinderinsulin (Hoechst) intravenös injiziert. Danach wurde mit dem Szintigraph (Frieseke u. Höpfner, Erlangen) von dem Versuchstier nach dreißig und dreiundvierzig Stunden ein Ganzkörperszintigramm angefertigt. Ein Kontrolltier bekam ebenfalls 100 µCi ^{131}J-Rinderinsulin und wurde dreiundvierzig Stunden post injectionem szintigraphiert.

Ergebnisse

Im Organismus wird ^{131}J-Insulin normalerweise sehr rasch abgebaut. (ELGEE et al. 1953, KALLEE u. SEYBOLD 1954). Die Abbauprodukte gelangen teils als ^{131}J-Ionen, teils als ^{131}J-haltige Aminosäuren in den Harn. Nur ganz geringe Mengen an ^{131}J-Insulin werden unverändert durch die Niere ausgeschieden. (D'ADDABBO et al. 1964).
Der Schwund der Radioaktivität von intravenös injiziertem ^{131}J-Insulin aus der Blutbahn setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen.

A) Durchmischung des Insulins in den Gefäßen mit dem zirkulierenden Blutplasma.

B) Diffusion aus den Kapillaren in das Gewebe. Verschiedene Organe haben aber unterschiedliche Affinitäten zu Insulin aufzuweisen; außerdem werden die Organe verschieden stark durchblutet.

C) Diffusion des Insulins in die extravasalen Flüssigkeitsräume.

D) Rückkehr von proteingebundenen und von freien Spaltprodukten des Insulins aus den abbauenden Organen in die Blutbahn.

Beim Insulinschwund handelt es sich also um ein Mehrkomponentensystem. Infolgedessen kann bei normalen Individuen kein exponentiell-linearer Verlauf zu erwarten sein - weder bei der Messung der Gesamtradioaktivität noch nach einer Proteinfällung. Da sich die Vorgänge des Abstroms aus der Blutbahn und des Abbaus in den Geweben innerhalb

weniger Minuten gleichzeitig abspielen, muß die Abweichung von einer e-Funktion schon a priori noch stärker ausgeprägt sein als bei radioaktiven Plasmaproteinen. (OEFF 1954, MATTHEWS 1957, BENNHOLD u. KALLEE 1959).
Diese Abweichung vom linearen Verlauf ist bei den Kontrolltieren der Abbildung 1 und 2 deutlich zu erkennen. Dagegen ist bei denjenigen Kaninchen, deren Blut große Antikörpermengen enthält, der Radioaktivitätsschwund schon eher einer linearen Exponentialfunktion angenähert. Dies ist hauptsächlich darauf zurückzuführen, daß eine starke Bindung an humorale Antikörper das Insulin vor einem raschen Abbau schützt und seinen Abstrom in den extravaskulären Raum verzögert. Vermutlich dürfte bei vollständiger Bindung des ^{131}J-Insulins an die Antikörper der Radioaktivitätsschwund sich mit dem Schwund der entsprechenden Gammaglobulinfraktion decken.

Wie aus Abbildung 1 ferner zu entnehmen ist, war der Radioaktivitätsschwund bei den Kaninchen der Gruppe I, die doppelt soviel Antigen erhalten hatten als die Gruppe II, erheblich stärker verzögert. Die Beeinträchtigung des Insulinstoffwechsels ist nicht nur aus dem verzögerten Initialschwund (innerhalb der ersten zehn Minuten nach der Injektion) zu erkennen, sondern kommt im weiteren Verlauf der TCA-Präzipitatkurven zum Ausdruck.
Zwei weitere Serien von Versuchstieren wurden gegen Cysteininaktiviertes Insulin sensibilisiert. Bei der Cysteininaktivierung tritt teils eine Spaltung des Insulinmoleküls in die A- und B-Kette auf, teils wird das Insulin durch Polymerisierung denaturiert. Obwohl diese Kaninchen mit sehr hohen Insulindosen

ansteigend sensibilisiert wurden, wirkte sich die Antikörperbildung nicht so stark auf den Schwund von ^{131}J-Insulin aus (Abb. 2) wie bei den Tieren, die gegen intaktes Insulin sensibilisiert worden waren (Abb. 1). Analog zur Versuchsreihe zu Abb. 1 war auch in Abb. 2 eine gewisse Abhängigkeit des Schwundes von der applizierten Antigenmenge zu erkennen.

Für einen orientierenden Versuch über die Persistenz von radioaktivem Insulin erhielten ein Kontrolltier und ein gegen cysteininaktiviertes Insulin hochgradig sensibilisiertes Kaninchen dieselbe Menge ^{131}J-Insulin. Dann wurden von beiden Kaninchen Szintigramme angefertigt. Während die Radioaktivität aus dem Kontrolltier nach 43 Stunden bis auf eine Restaktivität in der Schilddrüse völlig verschwunden war, ließen die Szintigramme des sensibilisierten Kaninchens 30 Stunden nach der ^{131}J-Insulininjektion noch eine erhebliche Speicherung in der Lebergegend, zum Teil auch in den Nieren sowie in der Harnblase erkennen. Auch nach 43 Stunden fand sich im Bauchraum des Tieres noch eine deutlich darstellbare Radioaktivität, welche sich aber nicht eindeutig auf Leber, Niere, Darm oder Harnblase lokalisieren ließ.
Wie die Autoradiogramme in Abb. 3 zeigen, können Kaninchen bei einem hyperimmunisierenden Sensibilisierungsverfahren schon innerhalb von zwei bis drei Wochen erhebliche Mengen insulinbindende Gammaglobuline produzieren. Vor dem Auftreten insulinbindender Gammaglobuline ist eine Bindung von Insulin an ein alpha$_2$-Globulin zu beobachten.

Zusätzlich trat bei Kaninchen Nr. 79 am zwölften Tag und bei Kaninchen Nr. 82 am achten Tag im Bereich der $alpha_1$-Globuline eine scharfe Radioaktivitätsbande auf. Die $alpha_1$- und $alpha_2$-Banden nahmen mit zunehmender Bindung an Gammaglobuline wieder ab. Es muß dahingestellt bleiben, ob es sich bei der Bindung an alpha-Globuline um Antikörpervorstufen handelt, oder ob die Bindung an alpha-Globuline leichter reversibel ist als die Adsorption an Insulinantikörper aus der Gammaglobulingruppe. Möglicherweise handelt es sich bei der Bindung von Insulin an $alpha_2$M-Globuline um eine unspezifische Komplexbildung mit einer Serumpeptidase (Trypsinausschüttung infolge "Insulinitis" oder Pankreatitis? (RENOLD et al. 1963, DÜRR und KALLEE 1967).

Ein Kaninchen bildete im Verlauf der Sensibilisierung gegen intaktes Insulin mit Freund'schem Adjuvans wahrscheinlich sogar präzipitierende Antikörper. Da von diesem Tier nur zwei Milliliter Serum zur Verfügung standen, konnte der Antikörper lediglich anhand von Ouchterlony-Diffusionstests und Immunoelektrophoresen charakterisiert werden. Dieses Kaninchen starb - ebenso wie zahlreiche andere Kaninchen - unvermutet im Laufe der Sensibilisierung.

Diskussion

Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, ist auch das Kaninchen als Versuchstier für Studien über Immunologie des Insulins durchaus geeignet. Kaninchen bilden offenbar ebenso wie der Mensch mit einer gewissen Regelmäßigkeit insulinbindende Antikörper, die zur Gruppe der Gammaglobuline gehören. Auch im Bereich der alpha-Globuline konnte - wie beim Menschen - eine Bindung von Insulin festgestellt werden. Infolge der Antikörperbildung gegen Insulin wird auch bei Kaninchen der Schwund und Abbau von radiojodiertem Insulin in ähnlicher Weise verzögert wie bei insulinbehandelten Menschen.

Wenn auch die Anzahl der hier sensibilisierten Versuchstiere für eine endgültige komparative Aussage über Beziehungen zwischen Dosis und Wirkung zu gering ist, haben die Schwundkurven doch einen Anhaltspunkt dafür geliefert, daß die Schwundverzögerung abhängig ist von der absoluten Insulinmenge, welche für die Sensibilisierung verwendet wurde. Ferner haben die Versuche mit cysteininaktiviertem Insulin gezeigt, daß nicht nur biologisch intaktes Insulin zur Bildung von Insulinantikörpern führt, sondern auch ein Gemisch von A- und B-Ketten oder ein Insulinpolymerisat.

Die immunologische Spezies- Spezifität ist offenbar auch beim Kaninchen nicht besonders ausgeprägt. Antikörper, die durch Sensibilisierung gegen intaktes oder gegen inaktiviertes Schweineinsulin entstanden sind, verzögern beim Kaninchen auch den Stoffwechsel von radioaktivem Rinderinsulin in erheblichem, eindeutig meßbarem und statistisch gesichertem Ausmaß.

Auf die Humanmedizin übertragen, lassen die Befunde erwarten, daß beispielsweise ein Patient, der im Verlauf einer Substitution mit Schweineinsulin Antikörper gebildet hat, auch nach einer Umstellung auf Rinderinsulin voraussichtlich immer noch höhere Insulindosen brauchen wird, als wenn sein Serum keinerlei Insulinantikörper enthielte.

Über das Vorkommen insulinpräzipitierender Antikörper beim Menschen liegen bisher noch keine gesicherten Befunde vor. Vielleicht kommen aber solche präzipitierenden Antikörper auch beim Menschen häufiger vor, als man bisher angenommen hat. Denn nach RENOLD et al. können präzipitierende Antikörper innerhalb weniger Tage im Serum erscheinen und ebenso schnell wieder verschwinden. Andererseits waren im Tierversuch präzipitierende Insulinantikörper hier wie allerorts nur dann nachzuweisen, wenn die Tiere gleichzeitig mit Freund'schem Adjuvans behandelt wurden. Es ist also ebenso gut möglich, daß es sich hierbei um einen speziellen Effekt des obligaten, tuberkulinhaltigen Freund'schen Adjuvans handelt. Die Anwendung dieses Adjuvans kommt für die Patientenbehandlung nicht in Frage. Jedoch erscheint es denkbar, daß bei manchen besonders disponierten Diabetikern andere immunologische Reize - zum Beispiel eine interkurrente Tuberkulose oder eine unspezifische immunologische Reiztherapie oder dergleichen - zu einem ähnlichen Adjuvans-Effekt führen könnten.

Abbildung 1.

Einfluß der Sensibilisierung gegen intaktes Insulin auf den Schwund von ^{131}J-Insulin bei Kaninchen.

Zweiwöchentliche Sensibilisierung der Tiere gegen Schweineinsulin (Hoechst) zusammen mit Freund'schem Adjuvans.

I = drei Kaninchen nach Vorsensibilisierung mit je fünf Injektionen von 200 IE

II = vier Kaninchen nach Vorsensibilisierung mit je zwei bis drei Injektionen von 200 IE

III = achtzehn nicht sensibilisierte Kontrollkaninchen.

G = Gesamtradioaktivität des Serums

P = Radioaktivität der Trichloressigsäure-Präzipitate.

Abbildung 2.

Einfluß der Sensibilisierung gegen cysteinaktiviertes Insulin auf den Schwund von ^{131}J-Insulin bei Kaninchen in ansteigenden Dosen (10-80 Milligramm pro Injektion)

I = vier Kaninchen nach Vorsensibilisierung mit maximal 80 Milligramm pro Antigeninjektion

II = vier Kaninchen nach Vorsensibilisierung mit maximal 42 Milligramm pro Antigeninjektion

III = achtzehn nichtsensibilisierte Kontrollkaninchen.

G = Gesamtradioaktivität des Serums

P = Radioaktivität der Trichloressigsäure-Präzipitate.

Statistischer Vergleich der Schwundkurven sensibilisierter Tiergruppen mit den Schwundkurven von Kontrollkaninchen

Zeitpunkt (min)	$\bar{x}$ Abb.1.IG	$\bar{x}$ Abb.1.IIIG	n	s Abb.1.IG	s Abb.1.IIIG	t	P
10	51,7	10,27	21	± 15,1	± 2,7	12	< 0,01
25	43,9	9,31	21	± 11,2	± 2,2	13,2	< 0,01
40	41,3	9,02	21	± 10,7	± 2,3	9,1	< 0,01
85	31,8	7,97	21	± 7,3	± 2,1	12,6	< 0,01
100	29,9	7,64	21	± 7,6	± 2,1	11,9	< 0,01
115	30,2	7,29	21	± 5,7	± 2,3	13,2	< 0,01

Zeitpunkt (min)	$\bar{x}$ Abb.1.IP	$\bar{x}$ Abb.1.IIIP	n	s Abb.1.IP	s Abb.1.IIIP	t	P
10	46,7	6,2	21	± 13,3	± 1,9	14	< 0,01
25	43,0	3,97	21	± 8,2	± 1,3	20,9	< 0,01
40	39,3	3,04	21	± 6,8	± 0,93	23,0	< 0,01
85	29,6	1,93	21	± 3,8	± 0,7	31,5	< 0,01
100	29,7	1,77	21	± 3,9	± 0,55	17,0	< 0,01
115	25,6	1,74	21	± 3,4	± 0,4	35,0	< 0,01

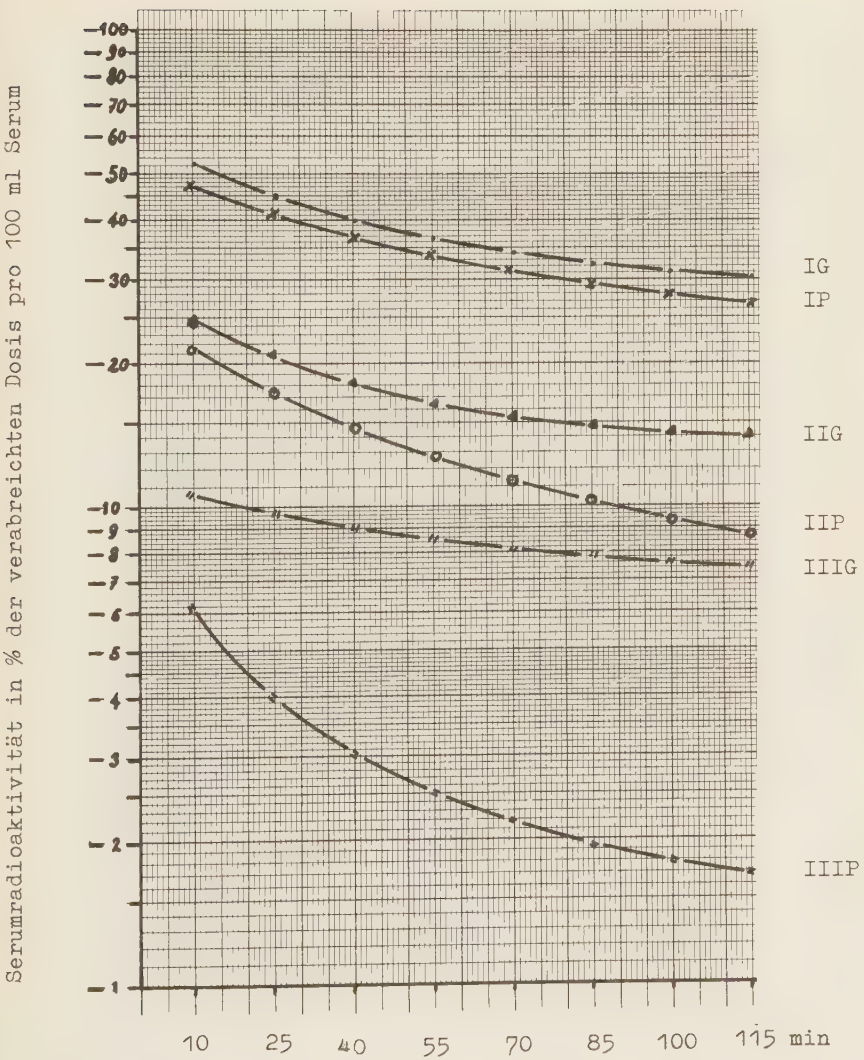
Zeitpunkt (min)	$\bar{x}$ Abb.2.IG	$\bar{x}$ Abb.2.IIIG	n	s Abb.2.IG	s Abb.2.IIIG	t	P
10	28,4	10,27	22	± 8,1	± 2,7	8,14	< 0,01
25	24,4	9,31	22	± 6,8	± 2,2	8,5	< 0,01
40	20,8	9,02	22	± 5,8	± 2,3	6,9	< 0,01
85	15,1	7,97	22	± 3,1	± 2,1	5,8	< 0,01
100	14,5	7,64	22	± 2,6	± 2,1	6,1	< 0,01
115	13,8	7,29	22	± 2,7	± 2,3	5,3	< 0,01

Zeitpunkt (min)	$\bar{x}$ Abb.2.IP	$\bar{x}$ Abb.2.IIIP	n	s Abb.2.IP	s Abb.2.IIIP	t	P
10	24,4	6,2	22	± 9,3	± 1,9	8,0	< 0,01
25	19,0	3,97	22	± 6,6	± 1,3	9,7	< 0,01
40	14,5	3,04	22	± 5,5	± 0,93	8,9	< 0,01
85	9,4	1,93	22	± 3,1	± 0,7	9,9	< 0,01
100	7,3	1,77	22	± 3,6	± 0,55	6,6	< 0,01
115	7,3	1,74	27	± 2,6	± 0,4	8,1	< 0,01

Zeitpunkt (min)	$\bar{x}$ Abb.1.IG	$\bar{x}$ Abb.2.IG	n	s Abb.1.IG	s Abb.2,IG	t	P
10	51,7	28,4	7	± 15,1	± 8,1	2,6	< 0,025P > 0,01
25	43,9	24,4	7	± 11,2	± 6,8	2,9	< 0,025P > 0,01
40	41,3	20,8	7	± 10,7	± 5,8	3,2	< 0,0125P 0,01
85	31,8	15,1	7	± 7,3	± 3,1	4,1	< 0,01
100	29,9	14,5	7	± 7,6	± 2,6	3,9	< 0,01
115	30,2	13,8	7	± 5,7	± 2,7	5,0	< 0,01

Zeitpunkt (min)	$\bar{x}$ Abb.1.IP	$\bar{x}$ Abb.2.IP	n	s Abb.1.IP	s Abb.2.IP	t	P
10	46,7	24,4	7	± 13,3	± 9,3	2,8	< 0,025P 0,01
25	43,0	19,0	7	± 8,2	± 6,6	4,2	< 0,01
40	39,3	14,5	7	± 6,8	± 5,5	5,2	< 0,01
85	29,6	9,4	7	± 3,8	± 3,1	7,6	< 0,01
100	29,7	7,3	7	± 3,9	± 3,6	7,0	< 0,01
115	25,6	7,3	7	± 3,4	± 2,6	8,0	< 0,01

Abbildung 1.



Zeit nach der Injektion von 10 µCi (≙ 0,54 µg Insulin) ^{131}J-Rinderinsulin

Abbildung 2.

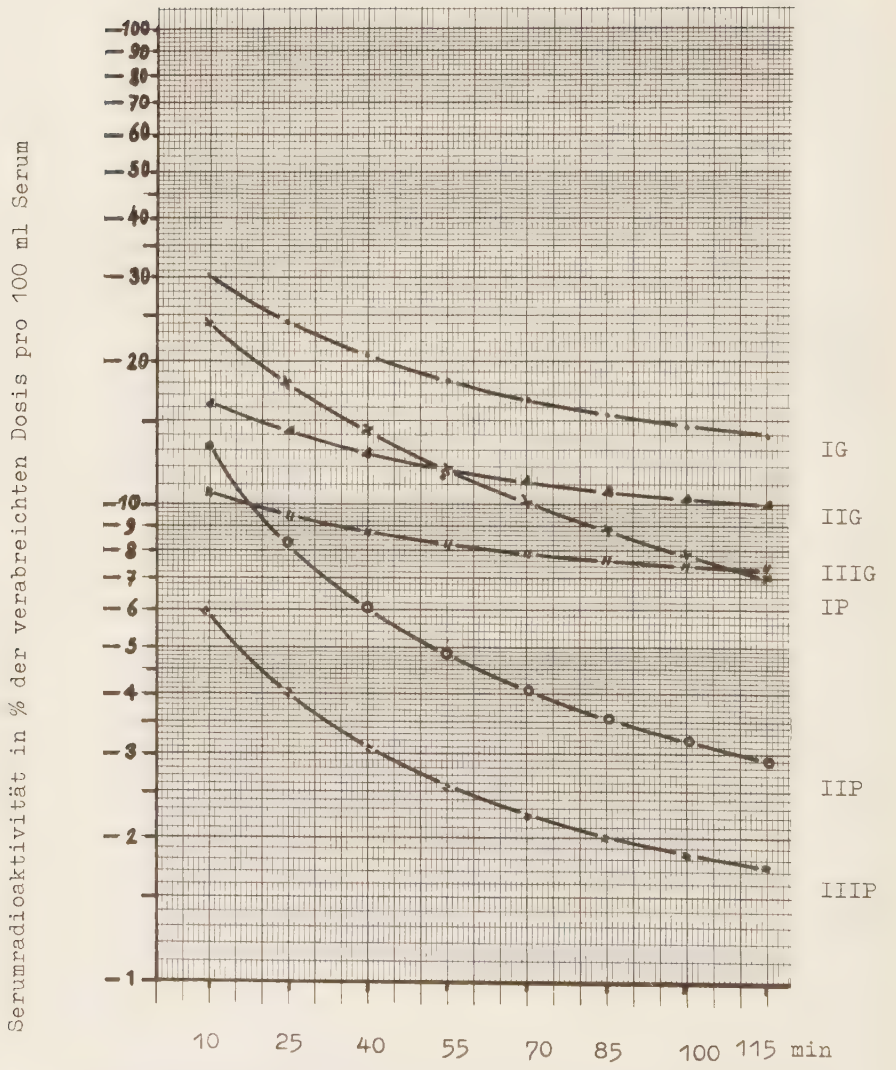

Serumradioaktivität in % der verabreichten Dosis pro 100 ml Serum
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
IG
IIG
IIIG
IP
IIP
IIIP
10
25
40
55
70
85
100
115 min
Zeit nach der Injektion von 10 µCi (≙ 0,54 µg Insulin) 131J-Rinderinsulin

Abbildung 3.

Geschwindigkeit der Neubildung von Insulinantikörpern. Die beiden Kaninchen waren nach dem Schema einer Hyperimmunisierung gegen ansteigende Mengen cysteininaktiviertes Schweineinsulin (zehn bis achtzig Milligramm) sensibilisiert worden. Im Serum beider Kaninchen ging der Insulinbindung an die Gammaglobuline eine vorübergehende Phase der Insulinbindung an ein $alpha_2$-Globulin voraus. ($alpha_2$ M, $gamma_1$ M?).

Insulinzusatz: 7 µg Schweineinsulin (Farbwerke Hoechst) mit ca. 10 µCi ^{131}J-Schweineinsulin (Hoechst) pro Milliliter Kaninchenserum; anschließend zweistündige Inkubation bei 37° C.

Abbildung 3.

BINDUNG VON 131-J-SCHWEINEINSULIN (HÖCHST) AN GAMMAGLOBULINE VON KANINCHEN IM VERLAUF DER IMMUNISIERUNG GEGEN ZYSTEIN-INAKTIVIERTES INSULIN (NOVO).

(AUTORADIOGRAMME VON AGARGEL-ZONENELEKTROPHORESEN)

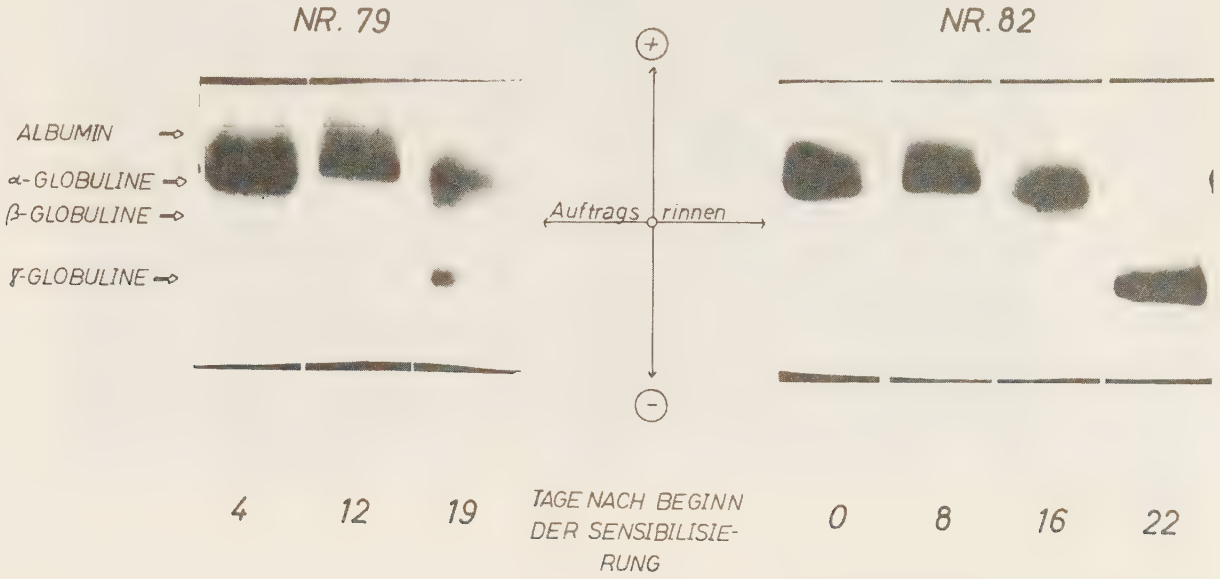


Abbildung 4.

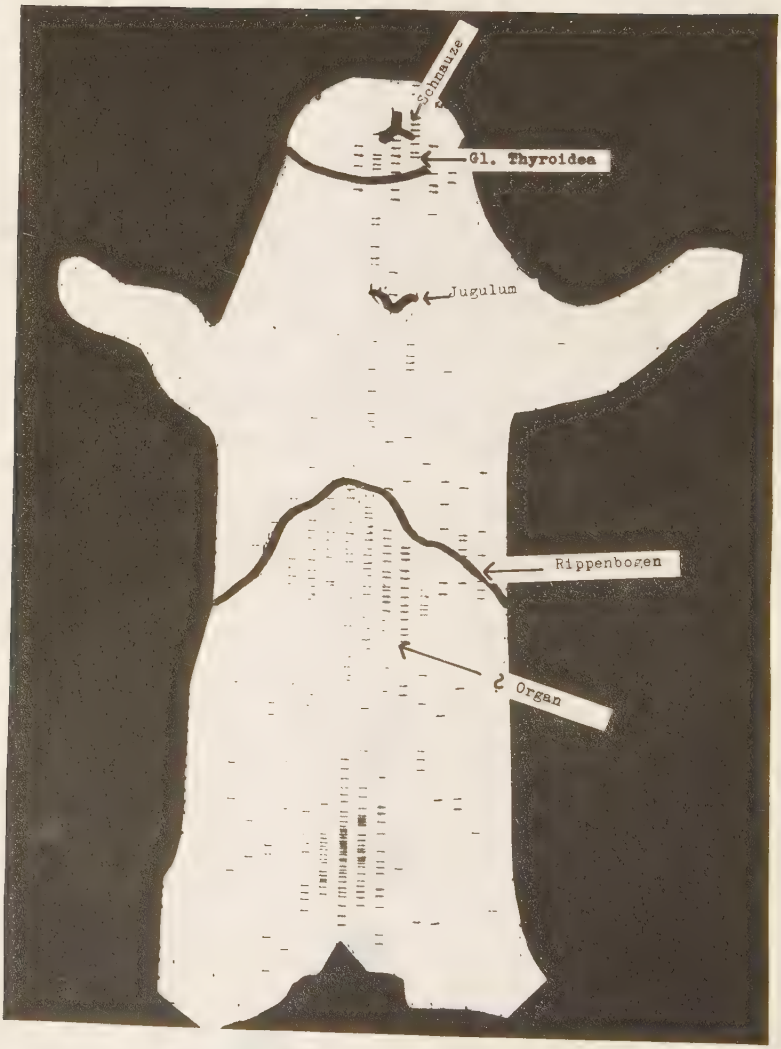
Szintigramme mit ^{131}J-Insulin

A = Kaninchen Nr. 91 vierundfünfzig Tage nach Beginn der Insulinsensibilisierung. 30 Stunden nach der Injektion von 100 µCi ^{131}J-Schweineinsulin.

B = Dasselbe Kaninchen 43 Stunden nach der Injektion von ^{131}J-Schweineinsulin.

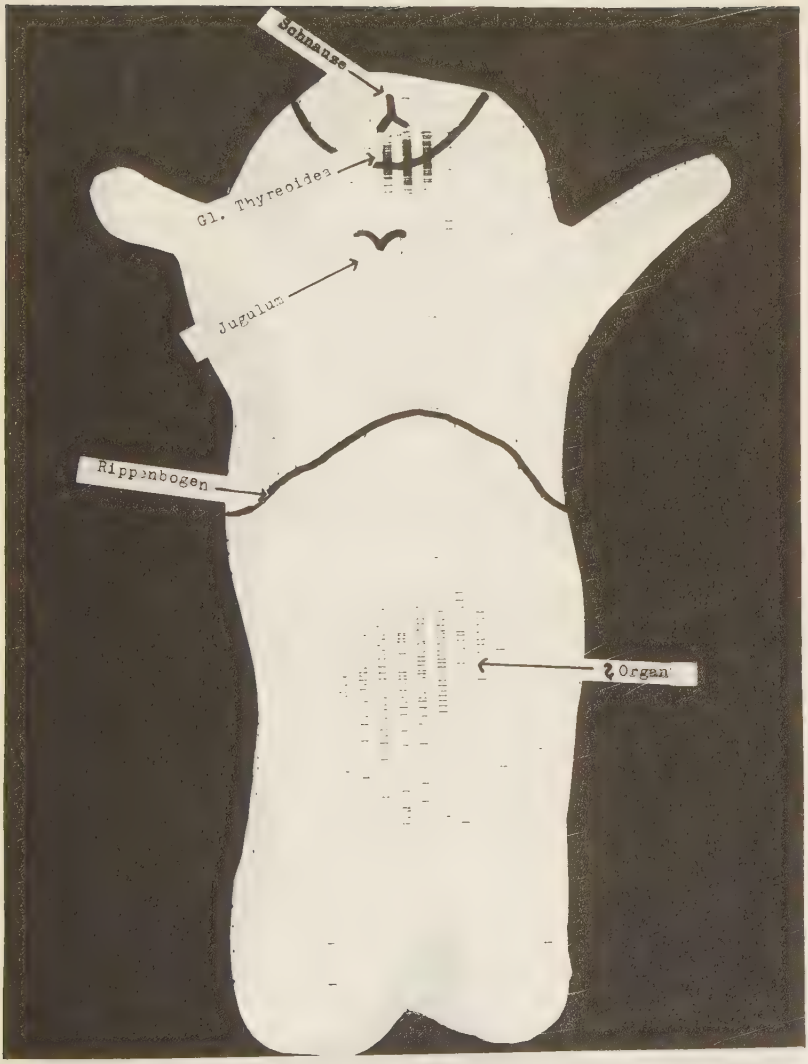
C = Kontrollkaninchen 43 Stunden nach der Injektion von 100 µCi ^{131}J-Schweineinsulin.

Abbildung 4.



A

Abbildung 4.



B

Abbildung 4.

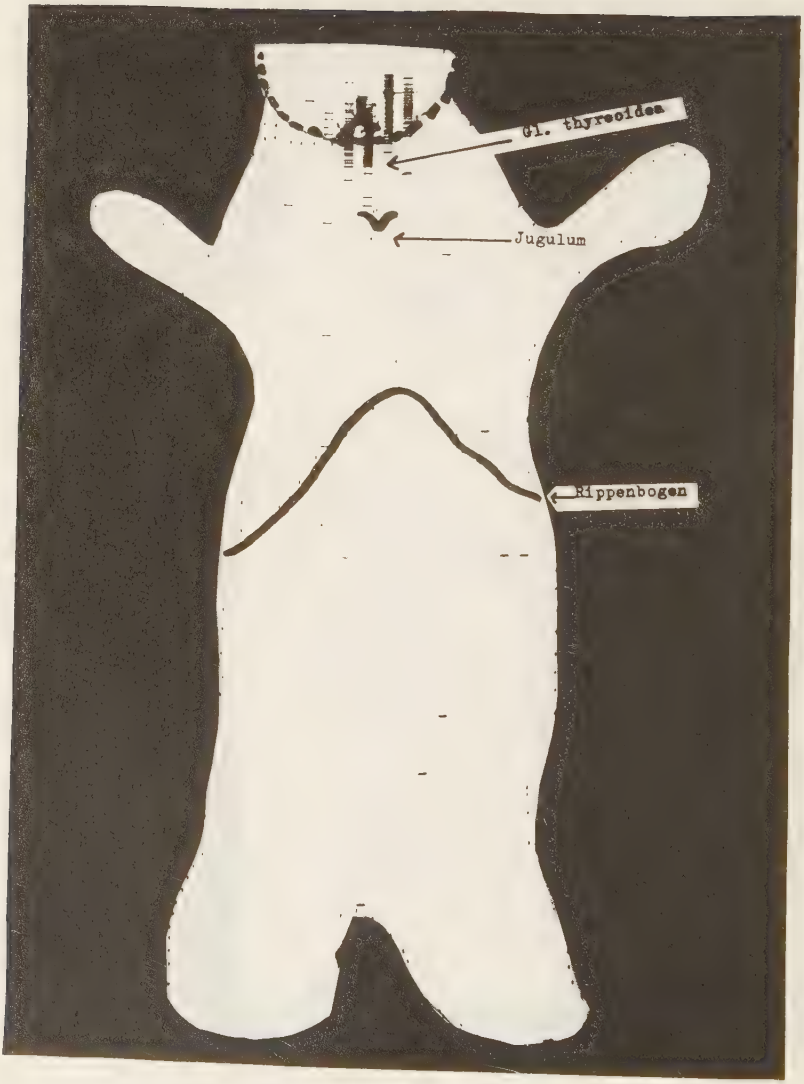


Abbildung 5.

Insulinpräzipitierende Antikörper.
Kaninchen Nr. 2, das eineinhalb Monate lang in zweiwöchigen Abständen mit Schweineinsulin (Hoechst) sensibilisiert wurde, ging etwa drei Tage nach der letzten Insulininjektion ein. Von dem Serum dieses Tieres wurde eine Immunelektrophorese und ein Autoradiogramm angefertigt.
Nach elektrophoretischer Auftrennung des Kaninchenserums wurde in die Mittelrinne ^{131}J-Schweineinsulin (10 µg/ml) gefüllt. Die Präzipitationssichel mit dem gamma$_3$-Globulin und die Präzipitation an der Auftragstelle war infolge der niedrigen Antigenkonzentration nicht im Nativbild zu erkennen, sondern wurde erst im Autoradiogramm sichtbar.

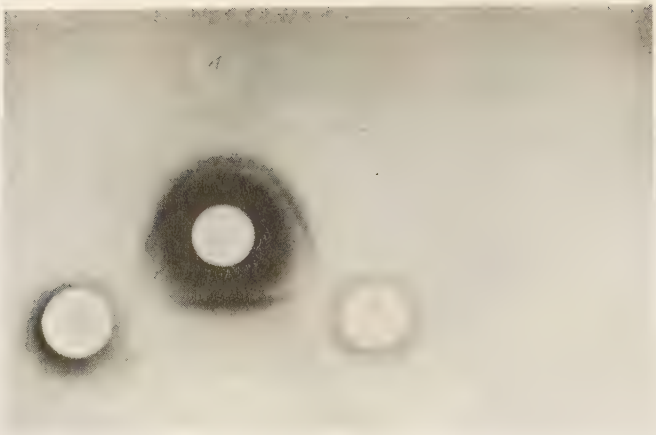


Abbildung 6.

Insulinpräzipitierende Antikörper

Ouchterlony - Diffussionstest.(Amidoschwarzfärbung).
Im Zentrum befindet sich Serum von Kaninchen Nr. 2.

1 = 0,05 prozentige Lösung von Schweineinsulin.
2 = Handelsübliches Altinsulin (Hoechst, 40 IE pro ml).
3 = 0,05 prozentige Lösung von cysteininaktiviertem Schweineinsulin.
4 = 0,25 prozentige Lösung von Schweineinsulin.
5 = 0,1 prozentige Lösung von cysteininaktiviertem Schweineinsulin.
6 = 0,1 prozentige Lösung von Schweineinsulin.

Zusammenfassung

Sieben Kaninchen wurden alle zwei Wochen gegen gleichbleibende Dosen von Schweineinsulin zusammen mit Freund'schem Adjuvans sensibilisiert. Sieben weitere Kaninchen erhielten ansteigende Dosen cysteininaktiviertes Schweineinsulin. Bei beiden Tiergruppen wurde der Schwund von intravenös injiziertem ^{131}J-Rinderinsulin aus der Blutbahn bestimmt und mit dem Schwund bei achtzehn nicht sensibilisierten Kontrolltieren verglichen.
Die Sensibilisierung gegen Schweineinsulin führte zu einer statistisch signifikanten Verzögerung des Schwundes und Abbaus von 131 J-Rinderinsulin. Am stärksten ausgeprägt war jeweils der Einfluß der Sensibilisierung auf den raschen Initialschwund innerhalb der ersten dreißig Minuten nach der Injektion von Radiojodinsulin.

Bei einem der Kaninchen traten präzipitierende Antikörper auf, die wahrscheinlich spezifisch gegen Insulin gerichtet waren.

LITERATUR

BERSON, S., and R. Yalow
Studies with insulinbinding antibody
Diabetes 6 : 402, 1957

BERSON, S., and R. Yalow
Recent studies on insulinbinding antibodies.
Ann. N.Y.Acad.Sci.82:338,1959

BENNHOLD, H. and E. KALLEE
Comparative studies on the half-life of J^{131}-labeled albumins and nonradioaktive human serum albumin in a case of analbuminemia.
J. Clin.Invest. 38:863, 1959

D'ADDABBO, A., E. KALLEE
Über ^{131}J-signiertes Insulin. V.Mitteilung: Einfluß von Immunisierung und Röntgenbestrahlung auf den Schwund von ^{131}J-Insulin.
Protides of the Biol.Fluids, Proceedings of the 8th Colloq., Bruges 1960, 255

D'ADDABBO, A., KALLEE, E., und F. LOHSS
Über ^{131}J-signiertes Insulin. IV.Mitteilung: Immunologische Studien und Prednisolonwirkung.
4.Intern.Symposion in Bad Gastein, 1960, Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung IV, Urban und Schwarzenberg, München, 1960.

D'ADDABBO, A., G.SEYBOLD und E.KALLEE
Der Einfluß von Hydrochlorothiazid auf die Insulinwirkung und den Abbau von ^{131}J-Insulin beim Kaninchen.
Z.Ges.Exp.Med.138:105, 1964

DIXON, F.
Metabolism of antigen and antibody.
J. Allergy, 25:487, 1954

DÜRR, H.K. und E. KALLEE
Spaltung von ^{131}J-Rinderinsulin durch reines alpha$_2$-Makroglobulin.
Z. Naturforschg.22b:793, 1967.

ELGEE, N.J., WILLIAMS, R.H., and N.D.LEE
Distribution and degradation studies with insulin-J^{131}
J.Clin.Invest.33:1252, 1954

HIRATA, Y., and BLUMENTHAL, H. T.
frecipitating of insulin.
J.Lab.Clin.Med.60:194, 1962

KALLEE, E., and G. SEYBOLD
Über ^{131}J-signiertes Insulin III (Verteilung im Rattenorganismus)
Z. Naturforschg. 9b:307, 1954

E. KALLEE, W. WILMANNS und G. WEISS.
Geschwindigkeit der Neubildung insulinbindender gamma-Globuline.
Z. Naturforschg. 18b:1122, 1963

MATTHEWS, C.M.E.
The theory of tracer experiments with ^{131}J-labelled
Physics i.Med.and Biol.2:36, 1957.

OEFF, K.
Umsatz von radioaktiven Serumeiweißfraktionen.
Ztsch.exp.Med.123:294,434, 1954.

RENOLD, A.E., J.S.SOELDNER, and J. STEINKE
Immunological studies with homologous and heterologous pancreatic insulin in the cow.
In: Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology.
(Hrsg.: P.CAMERON u. M.O'CONNOR) 15:122, 1963.
CHURCHILL, LONDON.

SKOM, J.H., and D.W. TALMAGE
The role of nonprecipitating insulin antibodies in diabetes.
J. Clin. Invest. 37:787, 1958.

SKOM, J.H., and D.W. TALMAGE
Nonprecipitating insulin antibodies.
J. Clin. Invest. 37:783, 1958.

STEIGERWALD, H., W. SPIELMANN, H. FRIES u. S.F. GREBE
Neuere Untersuchungen über die Antigenwirkung des Insulins
Klin.Wschr. 38:973, 1960

UEBELE, E.
Nachweis und Verteilung von ^{125}J-Humanalbumin bei sensibilisierten Mäusen.
Inaug.-Diss. Univ. Tübingen, 1964.

Herrn Professor Kallee habe ich für die Überlassung des Themas bestens zu danken.

Ferner gilt mein Dank Herrn Diplomphysiker E. Wechselberger für die statistische Beratung.

Lebenslauf.

Am 10. Januar 1939 wurde ich, Gerhard Weiss, als drittes Kind der Eheleute Hermann und Mathilde Weiss in Stuttgart geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Nellingen/Filder trat ich in das Humanistische Gymnasium in Esslingen a.N. ein, wo ich im Frühjahr 1960 die Reifeprüfung ablegte. Im Sommersemester 1960 begann ich an der Universität Tübingen mit dem Medizinstudium. Im Frühjahr 1961 bestand ich dort die Naturwissenschaftliche und im Frühjahr 1963 die Ärztliche Vorprüfung. Nach sechs weiteren Klinischen Semestern an der Universität Tübingen bestand ich am 26. Juli 1966 das Medizinische Staatsexamen.